

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.

A.0.4181

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

—
par

Monsieur Roland CASSINGENA

—
pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

—————

Sujet de la Thèse : LE GENOME VIRAL DANS LES CELLULES TRANSFORMEES
PAR LE VIRUS SV 40 : INDUCTION ET REPRESSON

Souténue le

10 AVR. 1970

— devant la Commission d'Examen

MM. François GROS Président

André LWOFF Examineurs

Paul TOURNIER

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.

A.O.4181

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

par

Monsieur Roland CASSINGENA

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : LE GENOME VIRAL DANS LES CELLULES TRANSFORMEES
PAR LE VIRUS SV 40 : INDUCTION ET REPRESSION

Soutenue le

devant la Commission d'Examen

MM. François GROS Président

André LWOFF Examineurs

Paul TOURNIER



VIROLOGIE. — *Mise en évidence d'un « répresseur » spécifique dans des cellules d'espèces différentes transformées par le virus SV 40.* Note (*) de MM. **Roland Cassingena** et **Paul Tournier**, transmise par M. Charles Gernez-Rieux.

Des cellules de diverses espèces animales transformées par le virus SV 40 synthétisent un « répresseur » de nature protéinique, spécifique de ce virus.

Les cellules transformées par le virus SV 40 ne produisent pas spontanément de virions mais contiennent du matériel génétique viral [(¹), (¹⁵), (²¹)]. Pour plusieurs lignées cellulaires il a été démontré que le génome viral est intégralement présent dans la majorité sinon dans toutes les cellules transformées [(³), (⁵), (⁷), (¹⁹), (²⁰)]. Dans ces cellules on ne détecte ni réplication autonome d'ADN viral [(⁴), (⁸), (¹³), (¹⁷)] ni synthèse d'antigènes de la capside du virion [(¹⁴), (¹⁵), (¹⁹)]. L'expression de certaines fonctions virales serait donc « réprimée ».

Dans ce travail nous montrons que les cellules transformées par le virus SV 40 renferment un « répresseur » de nature protéinique, spécifique de ce virus.

I. CELLULES. — Les cellules utilisées sont celles indiquées dans le tableau I. Elles sont cultivées en utilisant les techniques décrites dans un travail précédent (¹⁹).

II. VIRUS. — Virus SV 40 grande plage, souche Hilleman ; virus SV 40 petite plage, souche 777 ; virus de la stomatite vésiculaire (VSV), souche Indiana ; poliovirus type 1, souche Sabin ; virus vaccinal, souche Chany ; virus herpétique, souche Bricout. Pour chaque souche, un stock est préparé et titré — par la méthode des plages — sur cellules BSC-1.

III. POLY-L-LYSINE (TYPE 1, SIGMA). — Solution mère à 1 000 µg/ml de milieu sans sérum.

IV. PRÉPARATION D'UN EXTRAIT CELLULAIRE. — Les cellules sont mises en suspension dans du tampon Tris (0,01 M, pH 8,1) à raison de $5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ cellules par ml. Après avoir été ultrasonné 2 mn à basse fréquence et à + 4 °C, le matériel cellulaire est centrifugé 30 mn à 15 000 tr/mn et à la température indiquée. Le surnageant de centrifugation constitue l'extrait.

V. ESSAI D'UN EXTRAIT CELLULAIRE. — Des cultures confluentes de cellules BSC-1 en boîtes de Petri (Greiner) sont infectées avec 0,2 ml d'une dilution de virus calculée pour donner 50 à 100 UFP par boîte et sont incubées à 37 °C pendant 1 h.

Ensuite, des séries de 6 cultures reçoivent 0,2 ml par boîte : de milieu sans sérum (témoin virus), de solution de Poly-L-lysine à 10 µg/ml (témoin virus + Poly-L-lysine), d'extrait pur, dilué 1 : 2, 1 : 4 ou 1 : 8 (contenant ou non 10 µg de Poly-L-lysine par ml). Après avoir été remises pendant 30 mn à la température indiquée, toutes les cultures sont recouvertes de milieu gélosé et réincubées à 37 °C en atmosphère d'air à 5 % de CO₂. Le dénombrement final des plages est effectué au 14^e jour.

RÉSULTATS. — Des extraits de cellules de différentes espèces animales (Hamster, Souris, Chat) transformées par le virus SV 40, inhibent la multiplication de ce virus

TABLEAU I

*Inhibition de la multiplication du virus SV 40 dans des cellules de Singe (lignée BSC-1)
par des extraits de cellules d'espèces différentes transformées par ce virus*

Espèce cellulaire	Agent transformant	Cellules utilisées pour la préparation des extraits (5 × 10 ⁷ cellules/ml)	Réduction du nombre de plages SV 40 par rapport au témoin (a) (%)							
			Extrait + Poly-L-lysine (b) (10 µg/ml)		Extrait sans Poly-L-lysine			Témoin Poly-L-lysine (10 µg/ml)		
			pur	1/2	1/4	1/8	pur	1/2	1/4	1/8
Hamster syrien	0	Embryon de Hamster syrien en culture primaire								
	transf. « spont. » (c)	EHB (2)								
	20-Méthylcholanthrène	T. 20-MC XV (2)								
	Adénovirus 12	T. Ad. 12 III (2)								
	Virus du Polyome	T. Py XV (2)								
	Virus SV 40	TSV-11 (19)	2	31	16	2				
Souris	Virus SV 40	EHSVi (19)	0	36,5	13,5	3				
	Virus SV 40	Clone 2 TSV-5 (19)	2	36	17	6,5				
	0	Embryons de Souris (C 3 H) en culture primaire								
	transf. « spont. »	L (6)								
	Virus SV 40	Clone 1.1. mKS-BU 100 (5)	6	29	13	4,5				
	0	BSC-1 (10)								
Singe Cercopitèque	0	CV-1 (12)								
	Virus hybride	CV-1 LL « E-46 » (11)								
	Adéno-7-SV 40, irradié									
Chat	0	CH (18)								
	Virus SV 40	CHSV (18)	2,5	29	18	6,5				

(a) Moyenne de deux expériences (12 boîtes de Petri/point, avec dénombrement de 100 plages SV 40 en moyenne/boîte Témoin-virus).

(b) Polyamino-acide basique augmentant la perméabilité cellulaire (16).

(c) Transformation « spontanée ».

dans des cellules BSC-1 à condition qu'ils soient dilués dans certaines proportions et qu'ils soient additionnés d'un polymère basique (Poly-L-lysine) augmentant la perméabilité des cellules BSC-1. Cette inhibition n'est pas observée lorsqu'on utilise dans les conditions mentionnées, des extraits de cellules normales, transformées « spontanément », transformées par le virus du polyome, par l'adénovirus 12 ou par le 20-méthylcholanthrène. Elle n'est pas non plus observée avec des extraits de cellules de Singe cercopithèque transformées par du virus hybride Adéno 7-SV 40 irradié au Co^{60} et dans lesquelles le virus SV 40 est capable de se répliquer ⁽¹¹⁾ (tableau I). — Le « répresseur » présent dans un extrait de cellules transformées par le virus SV 40, est sans effet sur la multiplication du virus de la stomatite vésiculaire (VSV), du poliovirus type 1, du virus vaccinal ou du virus herpétique dans des cellules BSC-1 (tableau II).

TABLEAU II

Essais de l'action du « répresseur » SV 40 sur la multiplication du virus de la stomatite vésiculaire (VSV), du poliovirus type 1, du virus vaccinal et du virus herpétique dans des cellules de Singe (lignée BSC-1)

Virus	Réduction du nombre de plages SV 40 par rapport au témoin (a) (%)			
	Extrait de cellules EHSVi (b) (5×10^7 cellules/ml) + 10 µg de Poly-L-lysine/ml			
	pur	1/2	1/4	1/8
SV 40 g. p. (c)	5	29	14	2,5
SV 40 p. p. (d)	0	30	12	3
VSV	0	0	0	0
Poliovirus, type 1	0	0	0	0
Virus vaccinal	0	0	0	0
Virus herpétique	0	0	0	0

(a) Moyenne de 6 boîtes de Petri/point, avec dénombrement de 60 plages en moyenne/boîte Témoin-virus (b) Cellules de Hamster syrien transformées par le virus SV 40 (c) SV 40 grande plaque (d) SV 40 petite plaque.

— Ce « répresseur » est inactivé par la trypsine et par un séjour de 30 mn à 56 °C ; il n'est pas inactivé par la RNase ou par la DNase (tableau III).

TABLEAU III

Sensibilité du « répresseur » SV 40 à la trypsine, température, RNase et DNase

Extrait de cellules EHSVi (a) (5×10^7 cellules/ml) + 10 µg de Poly-L-lysine/ml	Réduction du nombre de plages SV 40 par rapport au témoin (b) (%)			
	pur	1/2	1/4	1/8
Témoin	4	31	17	6
+ Trypsine (c)	0	0	0	0
30 mn à 56 °C	0	0	0	0
+ RNase (d)	3,5	29	17	4,5
+ DNase (e)	5	31	15	4

(a) Cellules de Hamster syrien transformées par le virus SV 40 (b) Moyenne de deux expériences (12 boîtes de Petri/point, avec dénombrement de 100 plages SV 40 en moyenne/boîte Témoin-virus) (c) 170 µg/ml ; 30 mn à 37 °C ; inactivation de la trypsine par l'Iniprol (170 000 U. I. P./ml) (d) 200 µg/ml ; 30 mn à 37 °C (e) 250 µg (en présence de $\text{SO}_4\text{Mg } 5 \times 10^{-3} \text{ M}$)/ml ; 30 mn à 37 °C.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — Les raisons pour lesquelles un extrait de cellules transformées par le virus SV 40 — additionné de Poly-L-lysine mais non dilué — est pratiquement inactif sur la multiplication du virus SV 40 dans des cellules BSC-1, restent à préciser. Que le « répresseur » soit *spécifique du virus SV 40*, cela est démontré par le fait qu'on le retrouve seulement dans des cellules transformées par ce virus et qu'il n'agit pas sur la multiplication de virus différents. Ce « répresseur » est de *nature protéinique* puisqu'il est sensible à la trypsine et à la température mais non à la RNase ou à la DNase ; *il est possible qu'il soit d'information virale* puisqu'il est présent — comme le néo-antigène T-SV 40 ⁽¹⁵⁾ — dans des cellules de diverses espèces animales transformées par le virus SV 40. Le « répresseur » SV 40 ne correspond ni au néo-antigène T-SV 40, ni à une thymidine-kinase (TK) ⁽⁹⁾. En effet : 1. Les cellules CV-1 LL « E-46 » sont néo-antigène T-SV 40 positives ⁽¹¹⁾ et ne contiennent pas le « répresseur » SV 40 ; 2. Les cellules clonales mKS-BU 100, bien que TK négatives ⁽⁵⁾, contiennent le « répresseur » SV 40. L'absence de « répresseur » SV 40 dans les cellules CV-1 LL « E-46 », s'accorde avec leur sensibilité au virus SV 40 et s'explique par le fait que ces cellules ont été transformées par un virus dont la plupart des fonctions ont été inactivées par irradiation ⁽¹¹⁾.

Des essais de purification du « répresseur » SV 40 sont actuellement en cours.

(*) Séance du 25 novembre 1968.

- (1) T. BENJAMIN, *J. Mol. Biol.*, 16, 1966, p. 359-373.
- (2) W. BERNHARD et P. TOURNIER, *Int. J. Cancer*, 1, 1966, p. 61-80.
- (3) P. H. BLACK, *J. Nat. Cancer Inst.*, 37, 1966, p. 487-493.
- (4) R. CASSINGENA et P. MAY, *Comptes rendus*, 267, Série D, 1968, p. 250-252.
- (5) D. R. DUBBS, S. KIT, R. A. DE TORRES et M. ANKEN, *J. Virology*, 1, 1967, p. 968-979.
- (6) W. R. EARLE, *J. Nat. Cancer Inst.*, 4, 1943, p. 165-212.
- (7) P. GERBER, *Virology*, 28, 1966, p. 501-509.
- (8) P. GERBER et R. L. KIRSCHSTEIN, *Virology*, 18, 1962, p. 582-588.
- (9) M. HATANAKA et R. DULBECCO, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, Washington, 58, 1967, p. 1888-1894.
- (10) H. E. HOPPS, B. C. BERNHEIM, A. NISALAK et J. E. SMADEL, *Fed. Proc.*, 21, 1962, p. 454.
- (11) F. JENSEN et V. DEFENDI, *J. Virology*, 2, 1968, p. 173-177.
- (12) F. JENSEN, A. J. GIRARDI, R. V. GILDEN et H. KOPROWSKI, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, Washington, 52, 1964, p. 53-59.
- (13) S. KIT, T. KURIMURA, M. L. SALVI et D. R. DUBBS, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, Washington, 60, 1968, p. 1239-1246.
- (14) H. KOPROWSKI, F. C. JENSEN et Z. STEPLEWSKI, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, Washington, 58, 1967, p. 127-133.
- (15) J. H. POPE et W. P. ROWE, *J. Exp. Med.*, 120, 1964, p. 121-128.
- (16) H. J. P. RYSER, *Nature*, 215, 1967, p. 934-936.
- (17) A. B. SABIN et M. A. KOCH, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, Washington, 50, 1963, p. 407-417.
- (18) D. SAMOLYK (Données non publiées).
- (19) P. TOURNIER, R. CASSINGENA, R. WICKER, J. COPPEY et H. SUAREZ, *Int. J. Cancer*, 2, 1967, p. 117-132.
- (20) J. F. WATKINS et R. DULBECCO, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, Washington, 58, 1967, p. 1396-1403.
- (21) H. WESTPHAL et R. DULBECCO, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, Washington, 59, 1968, p. 1158-1165.

(Laboratoire de Virologie, I. R. S. C., B. P. n° 8, 94-Villejuif, Val-de-Marne.)

VIROLOGIE. — *Synthèse du « répresseur » du virus SV 40 dans l'infection productive et abortive.* Note (*) de MM. **Roland Cassingena, Paul Tournier, M^{me} Eveline May, M^{lles} Simone Estrade et Marie-France Bourali**, transmise par M. Charles Gernez-Rieux.

Le « répresseur » du virus SV 40, dont nous avons montré la présence dans les cellules transformées par ce virus, est également synthétisé au cours des infections productives et abortives.

Dans un travail précédent nous avons montré que les cellules transformées par le virus SV 40 synthétisent un « répresseur » de nature protéique, spécifique du virus (¹).

Ce « répresseur » a été mis en évidence par la technique de réduction de plages : un extrait de ces cellules inhibe la multiplication du virus SV 40 dans des cellules de Singe (BSC-1) à condition qu'il soit dilué dans certaines proportions et qu'il soit additionné d'un polymère basique augmentant la perméabilité cellulaire (poly-L-lysine, 10 µg/ml). Le taux d'inhibition obtenu était de 30 % en moyenne.

Par la même méthode, nous avons essayé tout d'abord d'obtenir des taux d'inhibition supérieurs à ceux préalablement observés en additionnant à l'extrait cellulaire des doses différentes et non cytotoxiques de poly-L-lysine ou d'autres polymères basiques tels que la poly-D-lysine ou la poly-L-ornithine (⁴). Nous avons cherché ensuite à savoir si le « répresseur » est synthétisé au cours de l'infection virale de cellules permissives (infection productive) ou de cellules non permissives (infection abortive).

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — I. *Cellules.*

BSC-1 : Lignée de cellules de rein de Singe cercopithèque (²).

MA-104 : Lignée de cellules de rein de Singe rhésus, fournie par Microbiological Associates Inc. (Bethesda, Md., U. S. A.).

ES : Cellules d'embryons de Souris C₃H en culture secondaire.

EH : Cellules d'embryons de Hamster syrien en culture secondaire.

EHSVi : Lignée de cellules d'embryon de Hamster syrien transformées *in vitro* par le virus SV 40 (⁵).

Ces cellules sont cultivées de la façon décrite dans un travail antérieur (⁵).

II. *Virus.* — Stock de virus SV 40 (souche Hilleman) préparé sur des cellules BSC-1, concentré selon la technique de Koch et coll. (³), titré sur des cellules BSC-1 par la méthode des plages.

III. *Polymères basiques augmentant la perméabilité cellulaire* (⁴). — Poly-L-lysine (SIGMA), poly-D-lysine (MANN), poly-L-ornithine (SIGMA). Solutions mères à 1 000 µg/ml de milieu sans sérum.

IV. a. *Préparation d'un extrait de cellules transformées par le virus SV 40.* — Comme nous l'avons déjà précisé (¹).

b. *Préparation d'un extrait de cellules infectées par le virus SV 40.* — Comme pour un extrait de cellules transformées par ce virus ⁽¹⁾ mais en centrifugeant le lysat cellulaire 5 h à 35 000 tr/mn et à + 4 °C (ultracentrifugeuse Beckman L 4, rotor SW 65), puis en traitant le surnageant de centrifugation (extrait) à la DNase 30 mn à 37 °C (250 µg/ml, en présence de MgSO₄ 5 × 10⁻³ M). On a toujours vérifié l'absence de virions dans l'extrait.

V. *Essai d'un extrait cellulaire.* — Il est effectué sur des cellules BSC-1, de la façon déjà décrite ⁽¹⁾.

RÉSULTATS. — En utilisant un extrait de cellules du type EHSVi dilué dans certaines proportions et additionné de poly-L-lysine (5 à 20 µg/ml), la multiplication du virus SV 40 dans des cellules BSC-1 est inhibée à des taux toujours inférieurs à 40 %.

TABLEAU I

Inhibition de la multiplication du virus SV 40 dans des cellules BSC-1 par un extrait de cellules EHSVi additionné de polymères basiques différents

Polymère	µg de polymère par ml	Réduction du nombre de plages SV 40 par rapport au Témoin (a) (%)								Polymère
		Extrait EHSVi (5 × 10 ⁷ cellules/ml) + Polymère								
		Brut	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	
Poly-L-lysine	5	0	28	15	0	NF (b)	NF	NF	NF	} Néant
(P. M. = 195 000)	10	0	36,5	13,5	0	NF	NF	NF	NF	
	20	0	15	30	13	0	NF	NF	NF	
Poly-D-lysine	10	0	10	29	45	31	14	0	0	
(P. M. = 65 000)	20	0	14	31	39	24	0	0	0	
Poly-L-ornithine	5	0	19	28	36	25	18	0	NF	
(P. M. = 90 000)	10	0	22	35	53	27	23	15	0	
	20	0	33	44	56	40	21	NF	NF	

^(a) Moyenne de 12 boîtes de Petri/point, avec dénombrement de 70 plages SV 40 en moyenne/boîte Témoin virus.

^(b) NF : non fait.

Des taux d'inhibition de l'ordre de 40 % peuvent être obtenus en remplaçant dans l'extrait la poly-L- par la poly-D-lysine (10,20 µg/ml), et on peut atteindre jusqu'à environ 50 % d'inhibition avec un extrait additionné de poly-L-ornithine (10,20 µg/ml) (tableau I). Ce polymère a été donc adopté dans les expériences qui nous ont donné les résultats suivants :

— Le « répresseur » est synthétisé au cours de l'infection productive et abortive (tableaux II et III).

— Pour qu'il soit détectable au cours de l'infection productive, la multiplicité d'infection doit être deux fois supérieure à la multiplicité suffisante pour permettre une mise en évidence au cours de l'infection abortive (tableau II).

TABLEAU II

Synthèse du « répresseur »-SV 40 dans des cellules permissives (BSC-1, MA-104)
et non permissives (ES, EH) infectées par le virus SV 40

Cellules				Réduction du nombre de plages SV 40 par rapport au Témoin ^(a) (%)								
Permissives	Non permissives	Multiplicité d'infection (UFP/cellule)	Heures après l'infection	Extrait cellulaire (5 × 10 ⁷ cellules/ml) + 10 µg de Poly-L-ornithine/ml								
				Brut	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
BSC-1		$\left\{ \begin{array}{c} 10 \\ 20 \\ 40 \end{array} \right\}$	18	0	0	0	0	0	0	NF ^(b)	NF	NF
				0	0	17	30	14	0	0	0	NF
				NF	20	36	54	31	28	16	NF	NF
MA-104		$\left\{ \begin{array}{c} 10 \\ 20 \\ 40 \end{array} \right\}$	18	NF	0	0	0	0	0	0	NF	NF
				NF	0	19	36	22	0	0	NF	NF
				NF	19	35	48	30	17	0	NF	NF
ES		$\left\{ \begin{array}{c} 10 \\ 20 \\ 40 \end{array} \right\}$	18	NF	NF	25	36	23	0	0	0	0
				NF	15	25	41	29	18	0	NF	NF
				NF	25	28	42	53	40	32	20	0
EH		$\left\{ \begin{array}{c} 10 \\ 20 \\ 40 \end{array} \right\}$	18	NF	0	18	32	15	0	0	NF	NF
				NF	26	39	47	42	21	14	NF	NF
				NF	NF	16	31	41	29	15	0	0

^(a) Moyenne de 6 boîtes de Petri/point, avec dénombrement de 70 plages SV 40 en moyenne/boîte
Témoin virus.

^(b) NF = non fait.

TABLEAU III

Cinétique de la synthèse du « répresseur »-SV 40 dans des cellules permissives (BSC-1)
et non permissives (ES) infectées par le virus SV 40

Cellules		Multiplicité d'infection (UFP/cellule)	Heures après l'infection	Réduction du nombre de plages SV 40 par rapport au Témoin (*) (%)					
Permissives	Non permissives			Extrait cellulaire (5×10^7 cellules/ml) + 10 µg Poly-L-ornithine/ml					
				1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
BSC-1		20	6	0	0	0	0	0	0
			12	0	0	0	0	0	0
			18	0	21	29	16	0	0
			24	0	12	20	15	0	0
ES		20	6	0	0	0	0	0	0
			12	0	0	12	0	0	0
			18	15	25	41	29	18	0
			24	23	38	46	42	26	10
		10	6	0	0	0	0	0	0
			12	0	0	10	0	0	0
			18	11	19	30	25	0	0
			24	13	27	35	21	10	0

^(*) Moyenne de 6 boîtes de Petri/point, avec dénombrement de 70 plages SV 40 en moyenne/boîte.
Témoin virus.

— Tout au moins jusqu'à une multiplicité de 40, la quantité de « répresseur » produite dans des cellules permissives et non permissives 18 h après l'infection, est fonction de la multiplicité d'infection (tableau II).

— Dans des cellules non permissives infectées avec une multiplicité de 10 ou de 20, le « répresseur » est détecté plus tôt (12^e heure) que dans des cellules permissives infectées avec une multiplicité de 20 (18^e heure). Après 24 h d'infection, la quantité de « répresseur » décelée dans les cellules non permissives est plus élevée (1,5-2,5 fois) que celle que l'on décèle dans les cellules permissives (tableau III).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — La comparaison des résultats obtenus avec la poly-L-, la poly-D-lysine ou la poly-L-ornithine, conduit à sélectionner ce dernier polymère (P. M. = 90 000, 10 µg/ml) pour la mise en évidence du « répresseur » du virus SV 40.

Le mécanisme par lequel ces différents polymères basiques augmentent la perméabilité des cellules de mammifère à des macromolécules protéiques est encore à préciser ; on pense que leur fixation sur la membrane cellulaire produirait des modifications de charge qui stimuleraient la pinocytose ⁽⁴⁾.

— La synthèse du « répresseur » du virus SV 40 après une infection abortive de cellules de Souris ou de Hamster, apporte un nouvel argument en faveur de l'hypothèse selon laquelle cette protéine pourrait être d'information virale.

— La mise en évidence de ce « répresseur » au cours de l'infection productive nécessite soit l'emploi d'une plus forte multiplicité d'infection, soit une extraction plus tardive que dans l'infection abortive. Cette particularité suggère l'hypothèse qu'un facteur constitutionnel — présent dans les cellules permissives — pourrait bloquer l'action du « répresseur » et ainsi favoriser l'expression de la totalité du génome viral.

(*) Séance du 28 mai 1969.

(1) R. CASSINGENA et P. TOURNIER, *Comptes rendus*, 267, Série D, 1968, p. 2251-2254.

(2) H. E. HOPPS, B. C. BERNHEIM, A. NISALAK et J. E. SMADEL, *Fed. Proc.*, 21, 1962, p. 454.

(3) M. A. KOCH, H. J. EGGERS, F. A. ANDERER, H. D. SCHLUMBERGER et H. FRANK, *Virology*, 32, 1967, p. 503-510.

(4) H. J. P. RYSER, *Nature*, 215, 1967, p. 934-936.

(5) P. TOURNIER, R. CASSINGENA, R. WICKER, J. COPPEY et H. SUAREZ, *Int. J. Cancer*, 2, 1967, p. 117-132.

(Laboratoire de Virologie, I. R. S. C., B. P. n° 8,
94-Villejuif, Val-de-Marne.)

VIROLOGIE. — *Blocage de l'action du « répresseur » du virus SV 40 par un facteur constitutif des cellules permissives pour ce virus.* Note (*) de MM. **Roland Cassingena, Paul Tournier, M^{lles} Simone Estrade et Marie-France Bourali**, transmise par M. Charles Gernez-Rieux.

L'action du « répresseur » du virus SV 40 peut être bloquée par un facteur constitutif des cellules permissives pour ce virus. Ce facteur, de nature protéique, n'a pas été détecté dans les cellules non permissives.

Nous avons montré récemment que le « répresseur » du virus SV 40, présent dans les cellules transformées par ce virus ⁽²⁾, est synthétisé au cours des infections productives aussi bien qu'abortives ⁽³⁾.

Ce « répresseur », de nature protéique, est spécifique du virus SV 40. Il est détecté par la méthode de réduction de plages : un extrait de cellules transformées ou infectées par le virus SV 40 inhibe la multiplication de ce dernier dans des cellules de Singe (BSC-1). La pénétration du « répresseur » dans les cellules infectées nécessite que l'extrait soit dilué dans certaines proportions et qu'il soit additionné d'un polymère basique augmentant la perméabilité cellulaire (poly-L-, poly-D-lysine ou poly-L-ornithine).

La mise en évidence du « répresseur » au cours de l'infection productive requiert, soit l'emploi d'une plus forte multiplicité d'infection, soit une extraction plus tardive que dans l'infection abortive. Nous avons été ainsi conduits à l'hypothèse qu'un facteur constitutif, présent dans les cellules permissives, pourrait bloquer l'action du « répresseur » et de cette façon favoriser l'expression de la totalité du génome viral ⁽³⁾. Pour mettre cette hypothèse à l'épreuve, nous avons réalisé l'expérience suivante : un extrait de cellules transformées par le virus SV 40 et contenant par conséquent le « répresseur », a été mélangé *in vitro* à un extrait de cellules permissives ou non-permissives pour ce virus. La persistance de l'action du « répresseur » a été alors recherchée par la méthode générale déjà décrite.

I. CELLULES.

BSC-1 : Lignée de cellules de rein de Singe cercopithèque ⁽⁶⁾.

CV-1 : Lignée de cellules de rein de Singe cercopithèque ⁽⁸⁾.

CV-1 LL « E-46 » : Lignée de cellules CV-1 transformées par du virus hybride Adéno 7-SV 40 irradié au Co⁶⁰ ⁽⁷⁾.

MA 104 : Lignée de cellules de rein de Singe rhésus, fournie par Microbiological Associates Inc. (Bethesda, Md., U. S. A.).

ES : Cellules d'embryons de Souris C 3 H en culture secondaire.

L : Lignée de cellules de Souris C 3 H transformées « spontanément » ⁽⁴⁾.

EH : Cellules d'embryons de Hamster syrien en culture secondaire.

EHB : Lignée de cellules d'embryons de Hamster syrien transformées « spontanément » ⁽¹⁾.

T. Py. XV : Lignée cellulaire dérivée d'une tumeur provoquée chez le Hamster syrien par le virus Polyome ⁽¹⁾.

T. Ad. 7 : Lignée cellulaire dérivée d'une tumeur provoquée chez le Hamster syrien par l'Adénovirus 7. Elle nous a été fournie par le Dr J. Samaille (Institut Pasteur, Lille).

EHSVi : Lignée de cellules d'embryons de Hamster syrien transformées par le virus SV 40 ⁽¹⁾.

Ces cellules sont cultivées de la façon décrite dans un travail précédent ⁽¹⁾.

II. VIRUS. — Stock de virus SV 40 (souche Hilleman) préparé sur des cellules BSC-1, titré sur ces mêmes cellules par la méthode des plaques.

III. POLYMÈRE BASIQUE AUGMENTANT LA PERMÉABILITÉ CELLULAIRE ⁽¹⁰⁾. — Poly-L-ornithine, p. m. = 90 000 (SIGMA). Solution-mère à 1 000 µg/ml de milieu sans sérum.

IV. PRÉPARATION D'UN EXTRAIT CELLULAIRE. — Comme nous l'avons déjà précisé ⁽²⁾.

V. ESSAI D'UN EXTRAIT OU D'UN MÉLANGE D'EXTRAITS CELLULAIRES. — Dans tous les cas, il est effectué sur des cellules BSC-1 et de la façon déjà décrite ⁽²⁾.

RÉSULTATS. — Il convient de préciser qu'un extrait de cellules non infectées permissives ou non-permissives pour le virus SV 40, est sans effet sur la multiplication de ce virus dans des cellules de Singe (BSC-1) (tableaux I et II).

Lorsqu'un extrait de cellules contenant le « répresseur » (EHSVi) est mélangé *in vitro* à un extrait de cellules permissives, il n'est ensuite plus possible de mettre

TABLEAU I

Blocage de l'action du « répresseur »-SV 40 par un extrait de cellules permissives (BSC-1, CV-1, CV-1 LL « E-46 », MA-104)

Extraits cellulaires (5 × 10 ⁷ cellules/ml) + 10 µg poly-L-ornithine/ml		% d'augmentation (+) ou de réduction (—) du nombre de plaques SV 40 par rapport au Témoin (*)						
		Dilutions extrait cellulaire + 10 µg poly-L-ornithine/ml						1/64
		brut	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	
EHSVi	brut-1 : 64 dans milieu	0	— 10	— 24	— 42	— 26	— 14	0
BSC-1	brut-1 : 64 dans milieu	0	0	0	0	0	0	0
EHSVi	1 : 2-1 : 64 dans BSC-1 brut		+ 45	+ 27	+ 10	0	0	0
EHSVi	brut-1 : 64 dans milieu	0	— 17	— 29	— 45	— 32	— 15	0
CV-1	brut-1 : 64 dans milieu	0	0	0	0	0	0	0
EHSVi	1 : 2-1 : 64 dans CV-1 brut		+ 54	+ 35	+ 19	0	0	0
EHSVi	brut-1 : 64 dans milieu	0	— 20	— 41	— 48	— 34	— 23	0
CV-1 LL « E-46 ».	brut-1 : 64 dans milieu	0	0	0	0	0	0	0
EHSVi	1 : 2-1 : 64 dans CV-1 LL « E-46 »							
	brut		+ 43	+ 25	+ 19	0	0	0
EHSVi	brut-1 : 64 dans milieu	0	— 22	— 39	— 52	— 28	— 23	0
MA-104	brut-1 : 64 dans milieu	0	0	0	0	0	0	0
EHSVi	1 : 2-1 : 64 dans MA-104 brut		+ 35	+ 21	0	0	0	0

(*) Moyenne de 12 boîtes de Petri/point, avec dénombrement de 70 plaques SV 40 en moyenne/boîte Témoin virus.

TABLEAU II

Absence de blocage de l'action du « répresseur »-SV 40 par un extrait de cellules non permissives (ES, L, EH, EHB, T. Py XV, T. Ad. 7)

Extraits cellulaires (5 × 10 ⁷ cellules/ml) + 10 µg poly-L-ornithine/ml		% d'augmentation (+) ou de réduction (—) du nombre de plages SV 40 par rapport au Témoin (*)						
		Dilutions extrait cellulaire + 10 µg poly-L-ornithine/ml						
		brut	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
EHSVi..	brut-1 : 32 dans milieu	0	— 26	— 34,5	— 47	— 37	— 26	
ES	brut-1 : 32 dans milieu	0	0	0	0	0	0	0
EHSVi..	1 : 2-1 : 64 dans ES brut		— 22,5	— 36	— 45	— 30,5	— 23	— 19
EHSVi..	brut-1 : 32 dans milieu	0	— 23	— 32	— 47	— 41	— 23	
L.....	brut-1 : 32 dans milieu	0	0	0	0	0	0	0
EHSVi..	1 : 2-1 : 64 dans L brut		— 24	— 37	— 54	— 35	— 32	— 20
EHSVi..	brut-1 : 32 dans milieu	0	— 22	— 37	— 43	— 32	— 29	
EH.....	brut-1 : 32 dans milieu	0	0	0	0	0	0	0
EHSVi..	1 : 2-1 : 64 dans EH brut		— 16	— 33,5	— 41	— 27	— 24	— 13
EHSVi..	brut-1 : 32 dans milieu	0	— 13	— 25	— 35	— 22	0	
EHB....	brut-1 : 32 dans milieu	0	0	0	0	0	0	0
EHSVi..	1 : 2-1 : 64 dans EHB brut		— 14	— 27	— 39	— 27	— 15	0
EHSVi..	brut-1 : 32 dans milieu	0	— 28	— 36	— 51	— 40	— 28	
T. Py XV	brut-1 : 32 dans milieu	0	0	0	0	0	0	0
EHSVi..	1 : 2-1 : 64 dans T. Py XV brut		— 20	— 41	— 45	— 38	— 26	0
EHSVi..	brut-1 : 32 dans milieu	0	— 14	— 30	— 42	— 25	— 11	
T. Ad. 7.	brut-1 : 32 dans milieu	0	0	0	0	0	0	0
EHSVi..	1 : 2-1 : 64 dans T. Ad. 7 brut		— 21	— 21	— 38	— 26	— 13	0

(*) Moyenne de 12 boîtes de Petri/point, avec dénombrement de 70 plages SV 40 en moyenne/boîte Témoin virus.

TABLEAU III

Sensibilité du FBR (a) à la température et à la trypsine

Extraits cellulaires (5 × 10 ⁷ cellules/ml) + 10 µg poly-L-ornithine/ml		% d'augmentation (+) ou de réduction (—) du nombre de plages SV 40 par rapport au Témoin (b)						
		Dilutions extrait cellulaire + 10 µg poly-L-ornithine/ml						
		brut	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
EHSVi..	brut-1 : 64 dans milieu	0	— 21	— 36	— 48	— 37	— 23	— 12
EHSVi..	1 : 2-1 : 64 dans BSC-1 brut.....		+ 45	+ 31	+ 11	0	0	0
EHSVi..	1 : 2-1 : 64 dans BSC-1 brut chauffé 30' à 56 °C		— 25	— 32	— 47	— 35	— 20	— 10
EHSVi..	1 : 2-1 : 64 dans BSC-1 brut traité à la try- psine (c)		— 20	— 34	— 47	— 39	— 22	— 19

(a) Facteur bloquant le « répresseur » du virus SV 40.

(b) Moyenne de 12 boîtes de Petri/point, avec dénombrement de 70 plages SV 40 en moyenne/boîte Témoin virus.

(c) 170 µg/ml ; 30 mn à 37 °C ; inactivation de la trypsine par l'Iniprol (170 000 U. I. P./ml).

en évidence l'action du « répresseur ». On observe même — pour un mélange contenant de fortes concentrations de « répresseur » — une augmentation du nombre de plages SV 40 (tableau I).

Si un extrait cellulaire EHSVi est mélangé *in vitro* à un extrait de cellules non-permissives, l'action du « répresseur » demeure inchangée (tableau II).

Le facteur bloquant l'action du « répresseur » (FBR) est un facteur constitutif des cellules permissives pour le virus SV 40 (tableau I). Il est sensible à la température et à la trypsine (tableau III).

DISCUSSION. — La mise en évidence d'un FBR dans les cellules permissives pour le virus SV 40 permet, d'une part, de comprendre la présence du « répresseur » au cours de l'infection productive ⁽³⁾; d'autre part, elle peut aider à expliquer la possibilité d'induire la multiplication du virus SV 40 dans des cellules transformées, lorsque ces cellules forment des hétérocaryons avec des cellules permissives [(⁵), (⁹), (¹²)].

Le FBR est un facteur constitutif des cellules permissives pour le virus SV 40. En effet, il est présent dans ces cellules en l'absence d'infection. Il est de nature protéique puisqu'il est sensible à la température et à la trypsine.

Que le FBR soit détecté exclusivement dans les cellules permissives, suggère que — dans les cellules de mammifère — la possibilité d'aboutir à une infection productive ou abortive par le virus SV 40 dépendrait de la présence ou de l'absence dans ces cellules d'un facteur constitutif.

L'observation selon laquelle un extrait de cellules permissives pour le virus SV 40 et contenant par conséquent le FBR, est sans effet sur la multiplication de ce virus dans des cellules de Singe, peut signifier : ou bien, que le FBR pénètre difficilement dans des cellules de mammifère ; ou bien, qu'une fois introduit dans ces cellules, il est rapidement dégradé. C'est la première de ces hypothèses qui nous paraît la plus vraisemblable. Il est intéressant de rappeler que des essais d'induction de la multiplication du virus SV 40 dans des cellules transformées — par traitement des cellules avec un extrait de cellules permissives — ont jusqu'ici échoué ⁽⁵⁾.

Nous avons constaté que le blocage de l'action du « répresseur » révèle la présence, dans l'extrait de cellules EHSV_i, d'une substance — dont la nature reste à préciser — capable de favoriser la multiplication du virus SV 40 dans des cellules de Singe. Ce fait explique que, pour mettre en évidence le « répresseur » dans un extrait cellulaire de ce type, il soit nécessaire de diluer l'extrait dans certaines proportions.

(*) Séance du 23 juin 1969.

(1) W. BERNHARD et P. TOURNIER, *Int. J. Cancer*, 1, 1966, p. 61-80.

(2) R. CASSINGENA et P. TOURNIER, *Comptes rendus*, 267, Série D, 1968, p. 2251-2254.

(3) R. CASSINGENA, P. TOURNIER, E. MAY, S. ESTRADÉ et M. F. BOURALI, *Comptes rendus*, 268, Série D, 1969, p. 2834.

(4) W. R. EARLE, *J. Nat. Cancer Inst.*, 4, 1943, p. 165-212.

(5) P. GERBER, *Virology*, 28, 1966, p. 501-509.

(6) H. E. HOPPS, B. C. BERNHEIM, A. NISALAK et J. E. SMADEL, *Fed. Proc.*, 21, 1962, p. 454.

(7) F. JENSEN et V. DEFENDI, *J. Virology*, 2, 1968, p. 173-177.

(8) F. JENSEN, A. J. GIRARDI, R. V. GILDEN et H. KOPROWSKI, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 52, 1964, p. 53-59.

(9) H. KOPROWSKI, F. C. JENSEN et Z. STEPLEWSKI, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 58, 1967, p. 127-133.

(10) H. J. P. RYSER, *Nature*, 215, 1967, p. 934-936.

(11) P. TOURNIER, R. CASSINGENA, R. WICKER, J. COPPEY et H. SUAREZ, *Int. J. Cancer*, 2, 1967, p. 117-132.

(12) J. F. WATKINS et R. DULBECCO, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 58, 1967, p. 1396-1403.

(Laboratoire de Virologie, I. R. S. C., B. P. n° 8,
94-Villejuif, Val-de-Marne.)

